

专题介绍 Special Topics

植物水通道蛋白的运输和调节

李军, 乙引*

贵州师范大学生命科学学院, 贵阳 550001

Translocation and Regulation of Aquaporins

LI Jun, YI Yin*

School of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China

摘要: 水通道蛋白是细胞间和细胞内水分运输的主要通道, 其运输和调控对于植物细胞的水分稳态和胁迫响应具有重要作用。本文综述了水通道蛋白运输的分子机制以及结构修饰、门控、膜转运和异源四聚体等调节机制。

关键词: 水通道蛋白; 选择性运输; 门控机制; 结构修饰; 膜转运; 异源四聚体

水通道蛋白(aquaporin)是一种广泛分布于动物、植物和微生物的膜镶嵌蛋白, 属于MIP (major intrinsic protein)蛋白家族。自1992年发现水通道蛋白具有介导水分跨膜运输的功能后, 有关水通道蛋白结构和功能的研究取得了极大进展。研究表明, 水通道蛋白不仅具有水通道活力(Beitz等2006), 而且还具有透过甘油、尿素、甲酰胺、乙酰胺、甲基胺等中性分子(Maurel等1993; Rivers等1997; Dean等1999; Wallace和Roberts 2004)和硼、硅等营养元素(Johanson等2001; Quigley等2001)的功能, 在维持细胞水分稳态和调节植物生理过程中发挥重要作用(Maurel等2008)。本文综述了近年来在水通道蛋白运输和调控方面的研究进展, 特别是选择性运输和结构修饰、门控、膜转运和异源四聚体等调节的分子机制。

1 水通道蛋白的运输

1.1 水通道蛋白的结构 水通道蛋白是由四聚体组成的沙漏状结构。每个单体都具有水通道活性, 由5个短环(A-E环)连接的6个跨膜 α -螺旋组成, 其N-、C-末端及B、D环朝向细胞质, 而A、C、E环朝向细胞质外或液泡、分泌系统的内腔。B、D环各有一段高度保守的Asn-Pro-Ala序列(NPA), 它们与其他跨膜区域共同形成通道(Fujiyoshi等2002)。根据结构和定位, 水通道蛋白主要分为4类, 即质膜内在蛋白(plasma membrane intrinsic proteins, PIP)、液泡膜内在蛋白(tonoplast membrane intrinsic proteins, TIP)、类NOD26膜内在

蛋白(nodulin 26-like intrinsic protein, NIP)和小分子碱性膜内在蛋白(small and basic intrinsic proteins, SIP)。

1.2 水通道蛋白的选择性运输 植物的水通道蛋白类型多于动物。通道蛋白的类型越多, 表明通道的选择性越强(Chaumont等2005)。运用同源模型(homology modelling), 拟南芥的35个水通道蛋白可分为8个亚组。在玉米和水稻中还存在其他类型(Takano等2006)。所有PIP均高度保守, 孔道狭窄, 为典型的高水分选择性通道蛋白。相反, TIP和NIP具有多种孔道构象, 而SIP的孔道构象则非常罕见(Wallace和Roberts 2004)。

通常使用爪蟾卵母细胞或酵母表达系统研究植物水通道蛋白的运输特性。一般先用生长补偿法测定水通道蛋白的选择性, 再通过脂蛋白体重组技术在纯化膜或完整细胞中直接证实其运输活性。研究表明, 水通道蛋白具有很高的水分运输效率, 在1 MPa压力下每秒能运输 10^9 个水分子(Fujiyoshi等2002)。同时, 它还具有离子选择性, 尤其是能完全阻止 H^+ 透过, 维持膜两侧形成的跨膜质子梯度(Ishikawa等2005; Biela等1999; Dean等1999)。虽然如此, 一些PIP、TIP和NIP没有严格的水分专

收稿 2009-11-24 修定 2010-02-03

资助 国家自然科学基金(30460031)和贵州省优秀科技教育人才省长专项基金(黔省专合字[2008]26号)。

* 通讯作者(E-mail: yiyin@gznu.edu.cn; Tel: 0851-6702541)。

一性, 它们也能通透中性小分子或气体(Maurel 等 1993; Rivers 等 1997)。

1.3 水分和溶质运输的分子机制 水通道蛋白的选择性主要来源于排阻效应, 由以下 3 个因素决定。第 1 个因素是 NPA 序列。分子动力学模拟实验表明, NPA 序列的 Asn 可以在孔道内与水分子发生反应, 使其极化并重新定向(de Groot 等 2003)。第 2 个因素是 Ar/R (aromatic/Arg) 结构。它位于细胞质侧的通道口, 由 4 个 Arg 和芳香族氨基酸残基组成, 不仅可使通道具有立体构象, 而且 Arg 残基可对质子产生静电排斥(Fujiyoshi 等 2002)。第 3 个因素是弱相互作用。当溶质进入孔道后, 可与孔道内氨基酸侧链形成氢键和疏水作用, 造成空间位阻。譬如, 拟南芥 AtNIP6;1 对水分的渗透性较低, 对尿素则很高。如果将 NIP 的 Ala119 用 Trp 替换后, 孔道结构即发生改变, 对水的渗透性增强, 但却不能透过尿素(Robinson 等 1996)。

2 水通道蛋白的调控机制

2.1 结构修饰

水通道在植物细胞膜中含量丰富、疏水性强。因此, 相对于其他膜蛋白而言, 它更易于生化分析(Niemietz 和 Tyerman 2002)。通过质谱和膜蛋白组学分析证实, 水通道蛋白具有多种结构修饰, 包括翻译修饰和翻译后修饰(Santoni 等 2003, 2006; Nühse 等 2004; Daniels 和 Yeager 2005)。

同位素标记、质谱分析和免疫分析的实验证明, 在菜豆种子 PvTIP3;1、大豆根瘤 GmNOD26 和菠菜叶 SoPIP2;1 的 N-、C- 末端 Ser 上发生了磷酸化反应(Maurel 等 2002)。在 AtPIP2;1 的 B 环上有 1 个保守的磷酸化位点, 在 C- 末端有多个相邻且相互依赖的磷酸化位点(如 Ser280、Ser283)(Johansson 等 1996, 1998; Santoni 等 2003, 2006)。菠菜 SoPIP2 的 B 环 Ser119 也是磷酸化位点。此外, 拟南芥质膜 AtPIP2;1 的 N- 末端起始 Met 残基在翻译过程中被切除, 但 AtPIP1;1 的 Met 残基则被乙酰化(Santoni 等 2006)。再有, PIP2 在 N- 末端相邻位置发生甲基化, 如 AtPIP2;1 分别在 Lys3 位点和 Glu6 位点上发生 2 次和 1 次甲基化。虽然 Lys 甲基化也存在于组蛋白中, 但 Glu 甲基化在真核生物中却极为罕见(Santoni 等 2003, 2006)。尽管水通道蛋白的糖基化修饰并不常见, 但在 GmNOD26

和一些植物 TIP 中发现了糖基化, 它是水通道蛋白在膜转运过程中亚细胞定位所必需的(Daniels 和 Yeager 2005)。

2.2 门控机制

2.2.1 磷酸化 早在认识植物水通道蛋白功能之前, 人们就发现在 PvTIP3;1 的 N- 端以及 SoPIP2;1、GmNOD26 的 C- 端 Ser 残基都是磷酸化位点, 其磷酸化由 Ca^{2+} 依赖的蛋白激酶催化(Johanson 和 Chrispeels 1992; Weaver 和 Roberts 1992)。以后, 用质谱和放射性标记技术先后在拟南芥和玉米中证实了磷酸化现象(Chaumont 等 2005)。除 N- 或 C- 末端 Ser 外, 在细胞质侧第 1 个 NPA 基序元附近 B 环 Ser 也可被磷酸化。该 Ser 在所有 PIP 和一些 TIP 中是保守的, 位于 Arg/X-Lys-X-Ser-X-Arg 序列中, Ca^{2+} 依赖的蛋白激酶可识别此序列(Johansson 等 1996)。

通常认为水通道蛋白的磷酸化是细胞信号转导与水分运输调节的中介。已证明在所有植物 PIP 的 B 环上都存在磷酸化的位点(Törnroth-Horsefield 等 2006; Johansson 等 1996), 通过磷酸化途径, 可以直接、快速、可逆地实现植物水通道蛋白的门控调节(Johansson 等 1998)。通过 Western blot 技术, 用小麦 PIP2 中含磷酸化 Ser 多肽制备的抗体可以识别玉米提取物中的 PIP2。如果将该提取物中 PIP2 用磷酸酶处理后, 则抗体不能识别(Azad 等 2004)。在爪蟾卵母细胞的异源表达系统中, 以 Ala 替代 Ser, 可降低 SoPIP2;1 和 PvTIP3;1 的水通道活性(Johansson 等 1998); 加入蛋白激酶 A 的激活剂 cAMP, 增强了 PvTIP3;1 的水通道活性(Maurel 等 1995); 加入磷酸酶抑制剂冈田酸, 同样可增加 SoPIP2;1 和 GmNOD26 的活性(Johansson 等 1998; Guenther 等 2003)。此外, Törnroth-Horsefield 等(2006)在研究菠菜叶片植物水通道蛋白晶体结构变化后发现, 干旱胁迫使 SoPIP2;1 的 2 个保守的丝氨酸位点(Ser115 和 Ser274)脱磷酸化, 导致水通道处于关闭状态, 从而阻止了胞内水分流失。

SoPIP2;1 是目前唯一已知原子结构的植物水通道蛋白。当 SoPIP2;1 孔道处于关闭状态时, D 环通过离子键和 H 键锚定在 N- 末端尾部, 其上 Leu197 残基可作为疏水性栓塞在孔道的细胞质入口处堵塞孔道, 进而阻止水分子运输。但是, 当 B 环 Ser115 残基或 D 环 C- 末端 Ser274 残基磷酸化

后,破坏了该残基与相邻亚基D-环上氨基酸残基之间所形成的氢键,改变了 helix 5 和 D 环的构象,使 Leu197 残基从孔道移出,从而迫使孔道打开(Törnroth-Horsefield 等 2006)。

2.2.2 pH 和二价阳离子 游离 Ca^{2+} 和/或低 pH 可降低拟南芥悬浮细胞或根细胞质膜的水分通透性(Alleva 等 2006; Gerbeau 等 2002)。pH 值对门控的调节机制在于它能使 D 环 His193 质子化,导致其与 N-末端 Asp28 紧密连接,有助于锁定孔道关闭状态。在爪蟾卵母细胞中,当细胞质 pH 值从 7.0 下降到 6.0 后,拟南芥 AtPIP2;1、AtPIP2;2、AtPIP2;3 和 AtPIP1;2 均关闭孔道。研究表明,AtPIP2;2 的 D 环 His193 残基在 pH 感受和门控调节中起关键作用。以 Ala 替代 His197,减少了细胞质酸化对孔道的影响(Tournaire-Roux 等 2003)。AtPIP2;2 在细胞质侧不仅有酸性的 N-末端(pI 3.8),还有大量碱性氨基酸,使该侧膜表面带负电荷。当细胞质 pH 为 7.0 时,孔道处于开放状态,所有 His 残基不带电荷;当细胞质酸化(pH 6.0)后,His197 和暴露于细胞质的其他 His 残基全部质子化,带正电荷。值得一提的是,His103 在内膜蛋白中高度保守,是孔道的关键部分;而 His197 和 His264 则在植物 PIP 中高度保守。此时,D 环折叠并堵塞孔道的细胞质口,其上 Lys190、Arg191、Arg194 等碱性氨基酸残基和质子化 His197 残基与酸性 N-末端发生相互作用,稳定 D 环构象,保证孔道关闭。在 AtPIP2;2 的突变体实验中,突变体 H197D 始终保持孔道处于开放状态,而突变体 H197K 则使水分通道活力低下,对 pH 值不敏感。前者是由于负电荷 Asp 的存在干扰了 D 环与带负电荷的 N-末端之间的离子相互作用;后者是由于带正电荷的 Lys 削弱了 pH 值对 D 环与 N-末端之间相互作用的影响,使孔道处于关闭状态(Tournaire-Roux 等 2003)。此外,突变体 R194A 和 D195A 也降低了 pH 敏感性,但双突变体 R194A/H197A 和 D195A/H197A 则对 pH 不敏感。由此可见,所有 PIP 的 D 环上都有保守的 His 残基,它可感受 H^+ 。虽然 His197 不是唯一的 pH 感受位点,但它与 Arg194 和 Asp195 等氨基酸残基构成了水通道蛋白的电荷网络系统,并在稳定水通道关闭状态中起关键作用(Tournaire-Roux 等 2003)。

一般认为, Ca^{2+} 和其他二价阳离子的调节机制

与 H^+ 相似。N-末端 Asp28 和 Glu31 是二价阳离子的作用位点,它们与二价阳离子结合后,可稳定孔道的关闭构象,降低纯化质膜囊泡的水分运输活性(Gerbeau 等 2002)。拟南芥质膜的水分运输对 Ca^{2+} 不敏感,其 Ca^{2+} 半抑制浓度为 $50\sim 100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,但甜菜根质膜囊泡却很敏感,其 Ca^{2+} 半抑制浓度仅为 $10\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Alleva 等 2006; Gerbeau 等 2002)。但也有研究表明, Ca^{2+} 的调控机制与 pH 不同。它通过钙调蛋白与 C-末端结合,识别孔道周围水分子,从而限制水流通过(Németh-Cahalan 和 Hall 2004)。比较拟南芥野生型和突变体 AtPIP2;2 的水分通道活性,有助于阐明 Ca^{2+} 依赖的通道关闭的分子机制。此外,有研究指出在水分和温度等环境胁迫下游离 Ca^{2+} 通过直接抑制水通道蛋白而降低水分运输活性(Maurel 2007),但由盐胁迫诱导的水分运输抑制则可被 Ca^{2+} 解除,表明存在复杂的调节机制(Cabañero 等 2006)。

2.2.3 其他调节机制 用压力探针研究轮藻细胞膜渗透性,发现增加溶质体积和渗透压,降低水分通道活性,表明内聚力/张力是高浓度溶质存在下水通道蛋白门控调控的另一机制(Ye 等 2004)。根据这一模型,当溶质从孔道中排除时,会在孔道中产生负压张力,导致蛋白质变形,最终关闭孔道(Maurel 等 1995)。同样,在轮藻细胞中还发现, OH^- 也可诱导不可逆的水分运输抑制,表明氧化作用也参与了水通道蛋白的门控机制(Alleva 等 2006)。

在玉米幼根中还发现一种门控的机械抑制机制(Wan 等 2004)。用压力探针研究膨压脉冲对皮层细胞膜水分传导率的影响,当压力小于 0.2 MPa 时,产生可逆的水分传导抑制;继续增加压力,则造成不可逆抑制,除非有 ABA 存在。由此可见,植物可利用能量输入和张力调节的门控机制来感受膨压和周围水分的变化。水分在通过孔道时会造成孔道构象变化,其大小受水流速度影响。ABA 可直接连接孔道,快速进行水通道蛋白门控的正调节,从而保证膜水分渗透性。由于计算机模拟结果表明水通道蛋白能忍受超高水压和渗透压,因此,该模型需要得到进一步实验证实。

已有研究发现重金属、营养元素、温度和活性氧等因子都可影响水通道蛋白活性(Chaumont 等 2005; Lee 等 2004; Niemietz 和 Tyerman 2002)。 Hg^{2+}

可与孔道口 Cys 结合, 从而抑制水通道蛋白活性。除此之外, 其他因子调控的分子机制仍不清楚。

2.3 膜转运调控

不同的植物水通道蛋白分布在不同膜上。采用免疫化学和GFP融合蛋白表达技术发现, 大多数 PIP 和 TIP 分别定位在质膜和液泡(或囊泡)膜上(Reisen 等 2003), NIP 存在于非豆科植物的质膜和细胞内膜中(Johanson 等 2001), 3 种拟南芥 SIP 则存在于内质网中(Sakurai 等 2005)。此外, 一些通道蛋白在细胞中的分布较复杂。例如拟南芥质膜 PIP1 也存在于由质膜内陷形成的质膜体(plasmalemmasome)中, 它可加速质外体与液泡间的水分交换(Robinson 等 1996)。在拟南芥子叶中也可见 AtTIP1;1 存在于液泡的亚结构中(Saito 等 2002)。玉米 ZmPIP1;2 和 ZmPIP2;5 不仅存在于质膜上, 而且存在于细胞内膜和核周组分中, 它们可能是分泌系统中 PIP 运输的不同阶段(Chaumont 等 2000)。松叶菊水通道蛋白的定位也很复杂, McPIP2;1 存在于质膜, 而 McPIP1;4 却存在于液泡膜和其他中密度组分中(Kirch 等 2000; Vera-Estrella 等 2004)。对质膜水通道蛋白定位分析表明, 在植物中存在 3 种不同类型液泡膜, 与其上 TIP 类型相吻合(Jauh 等 1999)。

大量研究表明, 水通道蛋白的膜转运是水通道蛋白调节的重要机制。在根中, 该转运过程在盐胁迫 1 h 后即被诱导(Boursiac 等 2005)。同样, PIP 的定向转运也见于环境胁迫后的更长时间(Maurel 2007)。低渗胁迫可诱导松叶菊 McTIP1;2 重新定位, 从液泡膜组分转运到较高密度的内体(endosome)组分。该转运过程为膜运输抑制剂所抑制, 与水通道蛋白的糖基化有关(Vera-Estrella 等 2004)。事实上, 糖基化是水通道蛋白的定向转运及靶向膜插入的关键, 它可能是植物水通道蛋白的另一个调节机制(Hendriks 等 2004; Vera-Estrella 等 2004)。

此外, 磷酸化也是调节水通道蛋白膜转运的一种方式。加压素(antidiuretic hormone, ADH)可提高细胞内 cAMP 水平, 继而激活蛋白激酶 A, 使 AQP2 的 Ser256 磷酸化, 启动 AQP2 囊泡与质膜融合, 最终增加膜的通透性(Maurel 等 2008)。

2.4 异源四聚体调控(heteromerization)

水通道蛋白四聚体的组装对于蛋白的折叠、

稳定以及膜向定位转运至关重要。在植物质膜上, PIP1 和 PIP2 共同调节水分通道(Martre 等 2002)。在爪蟾卵母细胞表达系统中, 植物 PIP1 不能表达水通道活性, 部分原因是它不能被运输到质膜上。如果共表达 PIP1 和 PIP2, 则可形成异源四聚体, 加速 PIP1 的膜转运(Suga 和 Maeshima 2004; Zelazny 等 2007)。Temmei 等(2005)研究了含羞草 PIP1 和 PIP2 的功能, 指出 B 环磷酸化是 PIP1 调节的关键, 但它对 PIP1 和 PIP2 间的相互作用没有影响。只有当 PIP1 和 PIP2 共表达时, PIP1 的磷酸化才能促进水分运输。在拟南芥 PIP1 和 PIP2 的反义抑制实验表明, 它们作用于相同的水分运输单位(Fetter 等 2004)。

使用不同的 ZmPIP 进行共表达实验发现, 当 ZmPIP1;1 与 ZmPIP1;2 各自表达时, 通道活性均不高, 但当其共表达后, 活性增加, 表现出协同效应, 可能是蛋白的质膜定向位移得到加强的结果(Fetter 等 2004)。该效应也见于 ZmPIP1;2 与 ZmPIP2;5 的共表达, 但在未见 ZmPIP1;1 与 ZmPIP2;5 的共表达。突变体 ZmPIP1;1LE 是具有 ZmPIP1;2 的 E 环结构的 ZmPIP1;1, 其 E 环的 4 个氨基酸残基被替换(V246I、Q250R、H251D 和 A255N)。研究表明, ZmPIP1;1LE 在共表达系统中失去了 ZmPIP1;1 的特征, 而表现出 ZmPIP1;2 的行为(Fetter 等 2004)。此外, 用同源模型比较 ZmPIP1;1、ZmPIP1;1LE、ZmPIP1;2 和 ZmPIP2;5 的结构, 发现 V246I 位于 HE (hemi-helix E)尾部, 并朝向脂双层, 由于氨基酸的疏水侧链较大, 可以将 HE 挤压到孔道中; Q250R 和 H251D 位于 E 环中部, 它们使水通道蛋白表面带上相反的电荷, 可相互或与相邻极性氨基酸侧链形成离子键; A255N 位于 helix 6 的 N-端, 由于非极性氨基酸被分子量较大的极性氨基酸所取代, 其侧链更易于暴露于溶剂中。由此可见, E 环在将多亚基结构变化信息从 helix 6 传递到 NPA HE 上起重要作用, 它要么通过改变 NPA HE 结构影响通道活性, 要么通过改变 helix 6 结构影响通道蛋白的聚合(Maurel 等 2008)。

3 结语

水通道蛋白是细胞间和细胞内水分运输的主要通道。水通道蛋白的调控是植物保持细胞水分稳态和对环境胁迫快速响应的重要途径, 因此, 深入研究水通道蛋白运输及其活性调节有助于增强对

植物水分运输整合机制的认识。细胞膜上植物水通道活性的调节涉及到很多不同的机制。除基因表达调控外,水通道蛋白参与水分和中性小分子的跨膜流动过程还受到结构修饰、门控、膜转运和异源四聚体等各种机制的调控。近年来在这些方面的研究取得了很大进展,初步建立了PIP水通道蛋白的门控调节模型,鉴定了一些必需氨基酸残基和一些结构基序,但是,水通道蛋白开闭的分子机制仍未完全阐明,对水通道蛋白原子结构的分析及其门控构象的精确调控机制、异源四聚体亚基间的相互作用及其生理作用、蛋白磷酸化介导的水分运输调节机制以及水通道蛋白在植物细胞、组织和器官等层次的表达等方面均缺乏足够认识,均有待于进一步深入研究。

参考文献

- Alleva K, Niemietz CM, Sutka M, Maurel C, Parisi M, Tyerman SD, Amodeo G (2006). Plasma membrane of *Beta vulgaris* storage root shows high water channel activity regulated by cytoplasmic pH and a dual range of calcium concentrations. *J Exp Bot*, 57: 609~621
- Azad AK, Sawa Y, Ishikawa T, Shibata H (2004). Phosphorylation of plasma membrane aquaporin regulates temperature-dependent opening of tulip petals. *Plant Cell Physiol*, 45: 608~617
- Beitz E, Wu B, Holm LM, Schultz JE, Zeuthen T (2006). Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 269~274
- Biel A, Grote K, Otto B, Hoth S, Hedrich R, Kaldenhoff R (1999). The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. *Plant J*, 18: 565~570
- Boursiac Y, Chen S, Luu DT, Sorieul M, van den Dries N, Maurel C (2005). Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiol*, 139: 790~805
- Cabañero FJ, Martínez-Ballesta MC, Teruel JA, Carvajal M (2006). New evidence about the relationship between water channel activity and calcium in salinity-stressed pepper plants. *Plant Cell Physiol*, 47: 224~233
- Chaumont F, Barrieu F, Jung R, Chrispeels MJ (2000). Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. *Plant Physiol*, 122: 1025~1034
- Chaumont F, Moshelion M, Daniels MJ (2005). Regulation of plant aquaporin activity. *Biol Cell*, 97: 749~764
- Daniels MJ, Yeager M (2005). Phosphorylation of aquaporin PvTIP3;1 defined by mass spectrometry and molecular modeling. *Biochemistry*, 44: 14443~14454
- de Groot BL, Frigato T, Helms V, Grubmüller H (2003). The mechanism of proton exclusion in the aquaporin-1 water channel. *J Mol Biol*, 333: 279~293
- Dean RM, Rivers RL, Zeidel ML, Roberts DM (1999). Purification and functional reconstitution of soybean nodulin 26. An aquaporin with water and glycerol transport properties. *Biochemistry*, 38: 347~353
- Fetter K, van Wilder V, Moshelion M, Chaumont F (2004). Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. *Plant Cell*, 16: 215~228
- Fujiyoshi Y, Mitsuoka K, de Groot BL, Philippsen A, Grubmüller H, Agre P, Engel A (2002). Structure and function of water channels. *Curr Opin Struct Biol*, 12: 509~515
- Gerbeau P, Amodeo G, Henzler T, Santoni V, Ripoche P, Maurel C (2002). The water permeability of *Arabidopsis* plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. *Plant J*, 30: 71~81
- Guenther JF, Chanmanivone N, Galetovic MP, Wallace IS, Cobb JA, Roberts DM (2003). Phosphorylation of soybean nodulin 26 on serine 262 enhances water permeability and is regulated developmentally and by osmotic signals. *Plant Cell*, 15: 981~991
- Hendriks G, Koudijs M, van Balkom BWM, Oorschot V, Klumperman J, Deen PMT, van der Sluijs P (2004). Glycosylation is important for cell surface expression of the water channel aquaporin-2 but is not essential for tetramerization in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 279: 2975~2983
- Ishikawa F, Suga S, Uemura T, Sato MH, Maeshima M (2005). Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*, 579: 5814~5820
- Jauh GY, Phillips TE, Rogers JC (1999). Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuolar functions. *Plant Cell*, 11: 1867~1882
- Johanson U, Karlsson M, Johansson I, Gustavsson S, Sjövall S, Fraysse L, Weig AR, Kjellbom P (2001). The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol*, 126: 1358~1369
- Johansson I, Larsson C, Ek B, Kjellbom P (1996). The major integral proteins of spinach leaf plasma membranes are putative aquaporins and are phosphorylated in response to Ca^{2+} and apoplastic water potential. *Plant Cell*, 8: 1181~1191
- Johansson I, Karlsson M, Shukla VK, Chrispeels MJ, Larsson C, Kjellbom P (1998). Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell*, 10: 451~459
- Johnson KD, Chrispeels MJ (1992). Tonoplast-bound protein kinase phosphorylates tonoplast intrinsic protein. *Plant Physiol*, 100: 1787~1795
- Kirch HH, Vera-Estrella R, Gollack D, Quigley F, Michalowski CB, Barkla BJ, Bohnert HJ (2000). Expression of water channel proteins in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant*

- Physiol, 123: 111~124
- Lee SH, Singh AP, Chung GC, Ahn SJ, Noh EK, Steudle E (2004). Exposure of roots of cucumber (*Cucumis sativus*) to low temperature severely reduces root pressure, hydraulic conductivity and active transport of nutrients. *Physiol Plant*, 120: 413~420
- Martre P, Morillon R, Barrieu F, North GB, Nobel PS, Chrispeels MJ (2002). Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiol*, 130: 2101~2110
- Maurel C (2007). Plant aquaporins: novel functions and regulation properties. *FEBS Lett*, 581: 2227~2236
- Maurel C, Kado RT, Guern J, Chrispeels MJ (1995). Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin α -TIP. *EMBO J*, 14: 3028~3035
- Maurel C, Javot H, Lauvergeat V, Gerbeau P, Tournaire C, Santoni V, Heyes J (2002). Molecular physiology of aquaporins in plants. *Int Rev Cytol*, 215: 105~148
- Maurel C, Reizer J, Schroeder JI, Chrispeels MJ (1993). The vacuolar membrane protein γ -TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. *EMBO J*, 12: 2241~2247
- Maurel C, Verdoucq L, Luu DT, Santoni V (2008). Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu Rev Plant Biol*, 59: 595~624
- Németh-Cahalan KL, Hall JE (2000). pH and calcium regulate the water permeability of aquaporin 0. *J Biol Chem*, 275: 6777~6782
- Niemietz CM, Tyerman SD (2002). New potent inhibitors of aquaporins: silver and gold compounds inhibit aquaporins of plant and human origin. *FEBS Lett*, 531: 443~447
- Nühse TS, Stensballe A, Jensen ON, Peck SC (2004). Phosphoproteomics of the *Arabidopsis* plasma membrane and a new phosphorylation site database. *Plant Cell*, 16: 2394~2405
- Quigley F, Rosenberg JM, Shachar-Hill Y, Bohnert HJ (2001). From genome to function: the *Arabidopsis* aquaporins. *Genome Biol*, 3: 1~17
- Reisen D, Leborgne-Castel N, Özalp C, Chaumont F, Marty F (2003). Expression of a cauliflower tonoplast aquaporin tagged with GFP in tobacco suspension cells correlates with an increase in cell size. *Plant Mol Biol*, 52: 387~400
- Rivers RL, Dean RM, Chandy G, Hall JE, Roberts DM, Zeidel ML (1997). Functional analysis of nodulin 26, an aquaporin in soybean root symbiosomes. *J Biol Chem*, 272: 16256~16261
- Robinson DG, Sieber H, Kammerloher W, Schäffner AR (1996). PIP1 aquaporins are concentrated in plasmalemmasomes of *Arabidopsis thaliana* mesophyll. *Plant Physiol*, 111: 645~649
- Saito C, Ueda T, Abe H, Wada Y, Kuroiwa T, Hisada A, Furuya M, Nakano A (2002). A complex and mobile structure forms a distinct subregion within the continuous vacuolar membrane in young cotyledons of *Arabidopsis*. *Plant J*, 29: 245~255
- Sakurai J, Ishikawa F, Yamaguchi T, Uemura M, Maeshima M (2005). Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant Cell Physiol*, 46: 1568~1577
- Santoni V, Verdoucq L, Sommerer N, Vinh J, Pflieger D, Maurel C (2006). Methylation of aquaporins in plant plasma membrane. *Biochem J*, 400: 189~197
- Santoni V, Vinh J, Pflieger D, Sommerer N, Maurel C (2003). A proteomic study reveals novel insights into the diversity of aquaporin forms expressed in the plasma membrane of plant roots. *Biochem J*, 373: 289~296
- Suga S, Maeshima M (2004). Water channel activity of radish plasma membrane aquaporins heterologously expressed in yeast and their modification by site-directed mutagenesis. *Plant Cell Physiol*, 45: 823~830
- Takano J, Wada M, Ludewig U, Schaaf G, von Wirén N, Fujiwara T (2006). The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell*, 18: 1498~1509
- Temmei Y, Uchida S, Hoshino D, Kanzawa N, Kuwahara M, Sasaki S, Tsuchiya T (2005). Water channel activities of *Mimosa pudica* plasma membrane intrinsic proteins are regulated by direct interaction and phosphorylation. *FEBS Lett*, 579: 4417~4422
- Törnroth-Horsefield S, Wang Y, Hedfalk K, Johanson U, Karlsson M, Tajkhorshid E, Neutze R, Kjellbom P (2006). Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature*, 439: 688~694
- Tournaire-Roux C, Sutka M, Javot H, Gout E, Gerbeau P, Luu DT, Bigny R, Maurel C (2003). Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature*, 425: 393~397
- Vera-Estrella R, Barkla BJ, Bohnert HJ, Pantoja O (2004). Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. *Plant Physiol*, 135: 2318~2329
- Wallace IS, Roberts DM (2004). Homology modeling of representative subfamilies of *Arabidopsis* major intrinsic proteins. Classification based on the aromatic/arginine selectivity filter. *Plant Physiol*, 135: 1059~1068
- Wan X, Steudle E, Hartung W (2004). Gating of water channels (aquaporins) in cortical cells of young corn roots by mechanical stimuli (pressure pulses): effects of ABA and of HgCl₂. *J Exp Bot*, 55: 411~422
- Weaver CD, Roberts DM (1992). Determination of the site of phosphorylation of nodulin 26 by the calcium-dependent protein kinase from soybean nodules. *Biochemistry*, 31: 8954~8959
- Ye Q, Wiera B, Steudle E (2004). A cohesion/tension mechanism explains the gating of water channels (aquaporins) in *Chara* internodes by high concentration. *J Exp Bot*, 55: 449~461
- Zelazny E, Borst JW, Muylaert M, Batoko H, Hemminga MA, Chaumont F (2007). FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 12359~12364